

蛋白質間相互作用を阻害する非天然ペプチドの創製

東京大学大学院薬学系研究科薬化学教室

尾谷 優子

【はじめに】

タンパク質-タンパク質相互作用 (PPI) は生体内の多くの機能制御や情報伝達に関与している。PPI を阻害する化合物の中でも、人工アミノ酸を含むペプチドミミックは、生理活性を持つ研究ツールとしての応用が期待され、注目を集めている。一般的にペプチドは溶液中で種々の立体構造 (コンホメーション) を取りうる。立体構造制御能の高い非天然アミノ酸を用いて堅く安定な立体構造を創製することができれば、少ない残基数で PPI の相互作用面に結合し PPI を制御することが可能であると考えられる。また、非天然アミノ酸をペプチドに組み込み、刺激応答的にペプチド全体の立体構造を制御・変換する手法が確立できれば PPI 活性の制御に応用可能であると考えた。

本研究では、以下に示すように 2 種類の非天然型アミノ酸を創製し、PPI の制御に応用可能な基盤分子を創製した：

- (1) p53-MDM2 相互作用の阻害活性を持つ人工ヘリックスペプチドを見出し、結合モデルに基づいて阻害活性の最適化を行った。^[1]
 - (2) 光照射により構造変化を起こすアミノ酸を創製し、環状ペプチドに組み込んだハイブリッドペプチドを作り、光で立体構造を変化させることに成功した。
 - (3) 分子動力学計算の手法を用いて、われわれの報告した環骨格を含む非天然型アミノ酸の立体構造制御特性を網羅的に調査した。^[2]
- 以下に(1)および(2)について詳細を記述する。

【結果】

(1) p53-MDM2 相互作用の阻害活性を持つ人工ペプチドの創製^[1]

p53 はがん抑制因子として機能するタンパク質である。MDM2 および MDMX は p53 との PPI により MDM2/MDMX-p53 の負のフィードバックループを形成し、p53 を抑制的に制御する。p53-MDM2/MDMX 相互作用の阻害剤、すなわち MDM2/MDMX のアンタゴニストは、p53 の分解を防ぎ、p53 の細胞内活性を回復させる治療薬となる可能性がある。

以前われわれは、二環性 β -プロリンのペプチドオリゴマーが、最小単位の 2 残基ペプチドからすでに高度に構造化された安定な非天然型ヘリックス構造をとることを報告した。このうちの一種である伸張型ヘリックス構造をとる 3 残基ペプチド **1** が細胞のがん化や悪性化に関わる PPI である p53-MDM2/MDMX 相互作用を阻害することを見出した (図 1)。MDM2 とペプチドの結合モデルシミュレーションの結果、**1** は安定な伸張型ヘリックス構造を取り、わずか 3 残基で p53 が結合する領域を占めることが示唆された。

そこで本研究では、人工 3 残基ペプチドの構造活性相関を調べ、活性の最適化を行った。MDM2 との結合モデルシミュレーション (ドッキングシミュレーション) および複合体の分子動力学計算を行い、ペプチドと MDM2 の相互作用に重要な部分構造を推測した。その結果、ペプチドは自身の疎水性残基や側鎖置換基で MDM2 の疎水性ポケットと相互作用すること、ペプチドの N 末端の置換基と MDM2 との π - π 相互作用が重要であること、および C 末端のエステル部分がポケットから出ており周囲の水と接することが示唆された。そこで、ペプチドの N 末端と C 末端を改変した分子を各種合成した。阻害活性測定には ELISA 法を用いた。

その結果、N 末端に芳香環を持つ置換基やシクロヘキシル基があると、MDM2 / MDMX の結合ポケットへの結合が強化され、阻害活性が高まることが分かった。また、C 末端エステルを水溶性の高いカルボン酸に変換すると溶解性と阻害活性が向上することが分かった。**1** と比較して阻害活性の向上したペプチド **2** を見出した (図 1)。

さらに、熱力学的分析 (共同研究) により、阻害活性の高いペプチドがエントロピー駆動型のプロセスで MDM2 に直接結合することが確認された。また、野生型 p53 を持ち Mdm2 遺伝子が増幅されているヒト骨肉腫細胞株 SJSA-1 を用いた生物学的活性試験 (共同研究) の結果、ペプチド **2** は細胞内の p53-MDM2/MDMX 相互作用を阻害し、細胞内の p53 機能を救済できることが示された。

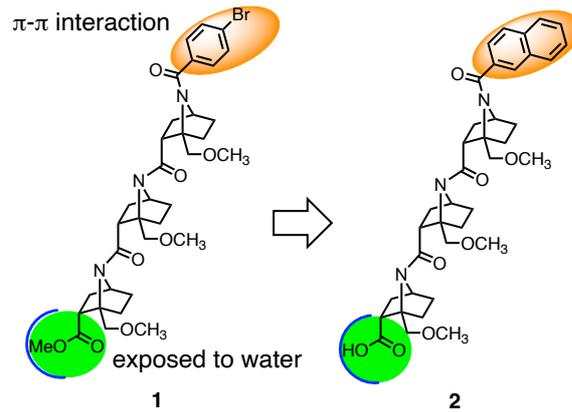


図 1 p53-MDM2/MDMX 相互作用を阻害する 3 残基ヘリックスペプチド

(2) 光照射により環状ペプチドの立体構造を変化させる人工アミノ酸の創製

一般的なアミド結合において、二級アミドはトランス体の構造をとるのに対し、三級アミドはシス体とトランス体が平衡で存在する。アミド窒素上に置換基を持たない (NH) ベンズアニリドは伸長型のトランスアミド体をとるが、アミド窒素上にメチル基などのアルキル置換基を導入すると折れ曲がったシスアミド体をとることが知られている。本研究では、光照射によりベンズアニリドのアミド窒素上の置換基を脱離させ、シスアミド体からトランスアミド体への変換を起こすことでペプチドコンホメーションのスイッチングに応用することを目的とした。

アミド窒素上に光照射で脱離可能な *o*-nitrobenzyl 基を導入したベンズアニリドを含む人工アミノ酸を創製した。この両末端に α -アミノ酸を結合させたモデル線形ペプチドに 390 nm の光を照射すると *o*-nitrobenzyl 基が脱離し、シスアミド体からトランスアミド体に変換することを見出した (図 2a)。さらに、複数の α -アミノ酸を結合させ環化したモデル環状ペプチド **CP1** を合成した (図 2b)。環状ペプチド **CP1** は ¹H-NMR においてシグナルが 1 セットのみであり、かつシスアミド体を示す芳香環どうしの NOE が見られたことから、**CP1** がシスアミド体みの構造をとることが確認された。このペプチドに DMSO やメタノール等の各種溶媒中で 390 nm の光を照射すると、高収率でトランスアミド体をとる **CP2** に変換された。詳細な NMR 解析や分子動力学計算の結果から、ベンズアニリドのシス-トランス変換がペプチド全体のコンホメーションの変化を誘起することが示唆された。本アミノ酸は PPI を制御する環状ペプチドの活性発現の制御に応用可能であると考えられる。

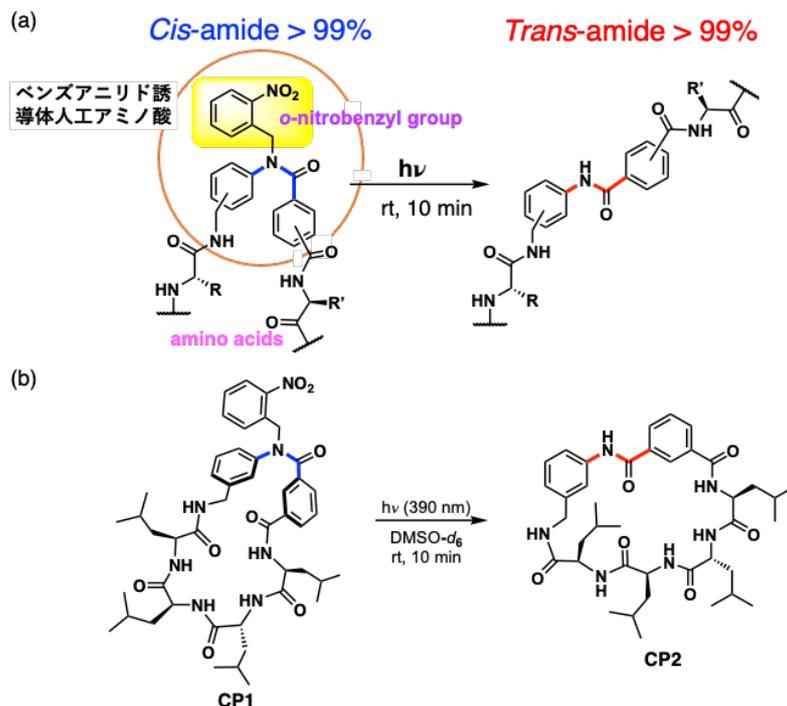


図 2 (a) 光照射による N-置換ベンズアニリド含有人工アミノ酸のシスアミド体からトランスアミド体への変換。(b) 光照射による環状ペプチドのシスからトランスへの変換と立体構造変化。

【発表論文】

- [1] A. Su, Y. Tabata, K. Aoki, A. Sada, *R. Ohki, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, S. Wang, Y. Otani, and *T. Ohwada. Elaboration of non-naturally occurring helical tripeptides as p53-MDM2/MDMX interaction inhibitor. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *69*, 681-692, **2021**. (Highlighted paper selected by editor-in-chief)
- [2] *Y. Otani, S. Park, T. Ohwada. Conformational preference of bicyclic β -amino acid dipeptides. *Chirality*, *32*, 790–807, **2020**.
- [3] L. Zhai, M. Nara, Y. Otani, *T. Ohwada. Unexpectedly Rigid Short Peptide Foldamers in which NH-p and CH-p Interactions are Reserved in Solution. *Chemical Communications*, *57*, 8344-8347, **2021**.